



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infecciosas

Leishmaniose visceral e infeção por VIH em retrospectiva de 2000 a 2017 num hospital central de Lisboa

João Pedro Bretes Menezes Caria

Junho'2018

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Doenças Infeciosas

**Leishmaniose visceral e infecção por VIH
em retrospectiva de 2000 a 2017 num
hospital central de Lisboa**

João Pedro Bretes Menezes Caria

Orientado por:

Dr. Robert Alfred Badura

Junho'2018

RESUMO

A leishmaniose visceral em contexto de infecção por VIH é caracterizada por alteração da expressão clínica, aumento da gravidade dos episódios clínicos, diminuição da resposta ao tratamento e à profilaxia secundária (além do aumento da incidência dos seus efeitos adversos), verificando-se aumento da letalidade e uma diminuição da sobrevida desta população. Realizámos um estudo retrospectivo e observacional em que foram analisados todos os casos de leishmaniose visceral confirmados por mielograma e co-infetados por VIH entre 2000 e 2017 no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria. O objetivo principal foi investigar a eficácia de terapêutica e da profilaxia instituída pela determinação de número de recidivas e sobrevida. Os objetivos secundários foram a caracterização epidemiológica e clínica da população. Foram estudados 24 indivíduos co-infetados por VIH, que totalizaram 44 episódios clínicos. A contagem sérica média de células CD4+ registada foi de 69 células/ μL , sendo que em apenas 2 dos 44 episódios a contagem sérica de células CD4+ foi superior a 200 células/ μL . A febre e hipergamaglobulinémia manifestaram-se com menos frequência do que na população imunocompetente, á semelhança do que está descrito na literatura. Um terço da população faleceu no primeiro episódio clínico. Metade da população que não faleceu no primeiro episódio veio a recidivar uma ou múltiplas vezes. A anfotericina B teve uma eficácia curativa de 62%. As medidas profiláticas instituídas preveniram a recidiva com uma eficácia mais de duas vezes superior á ausência de profilaxia. A sobrevida após 5 anos de follow-up foi de 46%. Conclui-se que a LV no contexto da infecção VIH é uma doença de prognóstico reservado. A resposta sub-ótima á terapêutica verificada no estudo sugere a instituição de esquemas de maior eficácia, como a terapêutica combinada relatada na literatura. A profilaxia secundária está indicada dada a importância na prevenção de recaídas.

Palavras-chave: Leishmaniose; visceral; VIH; tratamento; profilaxia

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis in the context of HIV infection is characterized by altered clinical expression, increased severity of clinical episodes, decreased response to treatment and secondary prophylaxis (along with an increased incidence of adverse events), further an increased lethality and decreased survival of this population is observed. We performed a retrospective, observational study analyzing all cases of visceral leishmaniasis (confirmed by bone marrow aspirates), and coinfected by HIV assisted at the Department for Infectious Diseases of Hospital de Santa Maria between 2000 and 2017. The main objective was to investigate the efficacy of therapy and the prophylaxis instituted by determining the number of relapses and survival. The secondary objectives were the epidemiological and clinical characterization of the population. Twenty-four HIV co-infected individuals were studied, with a total of 44 clinical episodes. The mean T-CD4 + lymphocyte count was 69 cells / μ L, and in only 2 of the 44 episodes this T-CD4 + count was greater than 200 cells / μ L. Fever and hypergammaglobulinemia manifested less frequently than in the immunocompetent population (ref), as described in the literature. One-third of the population died during the first clinical episode. Half of the population that survived the first episode, relapsed once or several times. Amphotericin B had a curative efficacy of 62%. The prophylactic measures instituted prevented relapses with an efficacy more than two times higher than without any prophylaxis. Survival after 5 years of follow-up was 46%. We concluded that LV, in the context of HIV infection, heralds a reserved prognosis. The suboptimal therapeutic response, verified in the study, might suggest that more effective regimens need to be pursued. Combination therapy could be an option, as it has been reported in the literature to be more effective. Secondary prophylaxis is globally indicated given the importance in relapse prevention.

Key-words: Leishmaniasis; visceral; HIV; treatment; prophylaxis

O trabalho final inclui a opinião do autor e não da FML.

ÍNDICE

• Lista de Abreviaturas	7
• Lista de Tabelas, Gráficos e Figuras	8
• Agradecimentos	10
• Introdução	11
• Materiais e Métodos	24
• Resultados	26
• Discussão	38
• Conclusão	46
• Referências	47

LISTA DE ABREVIATURAS

- VIH – Vírus da Imunodeficiência humana
- CD4+ / CD8+ - *Cluster of differentiation 4+ / cluster of differentiation 8+*
- LV – Leishmaniose visceral
- EV – Endovenoso(a)
- PCR - *Polymerase chain reaction*
- SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana adquirida
- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- TARV – Terapia Anti-retroviral
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- MSF – Médicos Sem Fronteiras
- IRA – Insuficiência Renal Aguda
- Th2 – *T helper 2*
- HSM – Hospital de Santa Maria, EPE.
- VHC – Vírus da Hepatite C
- ABL – Anfotericina B lipossômica
- MLT – Miltefosina
- ES – Estibogluconato de Sódio
- CCR5 - *C chemokine receptor type 5*

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

- Tabela 1- *Guidelines* de Tratamento e Terapia Antiretroviral (TARV) de acordo com as indicações da Organização Mundial de Saúde (OMS), Médicos sem Fronteiras (MSF; adaptado ao Sudão, Sudão do Sul e Etiópia). *A TARV é indicada em todos os doentes.*
- Tabela 2- Principais estudos/ensaios sobre tratamento da Leishmaniose Visceral em doentes coinfectados com *VIH*.
- Tabela 3- Principais estudos/ensaios sobre a profilaxia secundária da recaída da Leishmaniose Visceral em doentes co-infectados com *VIH*.
- Tabela 4 - Características demográficas/clínicas da população estudada
- Tabela 5 - Perfil imunológico da população estudada aquando do 1º Episódio clínico e Episódios recidivantes.
- Tabela 6 - Perfil imunológico da população estudada nos Episódios ocorridos na vigência e sem TARV.
- Tabela 7 - Apresentação clínica dos episódios de leishmaniose visceral estudados.
- Gráfico 1 - Distribuição temporal dos episódios clínicos estudados (o tempo total de estudo foi dividido em períodos de *três* anos, sendo contabilizada a relação primeiros episódios/episódios recidivantes em cada um destes períodos)
- Gráfico 2 - Principais comorbilidades reportadas na população estudada
- Gráfico 3 - Percentagem cumulativa de indivíduos vivos ao longo do tempo de estudo.
- Figura 1- Diagrama de fluxo indicativo do processo de seleção da população estudada
- Figura 2 - Terapêutica realizada e desfecho clínico dos episódios estudados.
[ABL-Anfotericina B lipossómica; MLT- Miltefosina; ES- Estibogluconato de sódio]

- Figura 3 - Profilaxia secundária realizada e desfecho clínico [ABL- Anfotericina B Lipossómica; ES-Estibogluconato de sódio; MLT- Miltefosina; Prof- Profilaxia]

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador de trabalho final de mestrado, o Dr. Robert Badura, por todo o tempo, energia e sapiência que emprestou ao desenvolvimento deste projeto de investigação. Saio desta etapa da minha formação com o apetite aumentado pelas atividades de investigação clínica, em boa parte pela sua orientação inspiradora.

Agradeço á Dra. Ana Miranda, responsável pelo laboratório de Hematologia do Hospital de Santa Maria, a ajuda na etapa inicial de deteção dos casos que foram posteriormente analisados neste trabalho.

Agradeço aos meus amigos José Cerdeira, Beatriz Lopes, Eduardo Silva, Duarte Lopes e Filipe Martinho e á minha família todo o apoio nesta fase do percurso académico que é encerre com a apresentação deste trabalho.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária sistémica causada pelos protozoários *Leishmania donovani donovani* (no subcontinente indiano e África Oriental) e *Leishmania donovani infantum* (nos países mediterrânicos) e *Leishmania donovani chagasi* (na América do Sul). A doença é transmitida por inoculação do protozoário na fase promastigota através da picada de um vector flebotídeo, a mosca da areia (dos géneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, consoante a localização geográfica).¹ Existem ainda vias alternativas de contágio horizontal (sexual, transfusional, partilha de seringas e picada accidental) e vertical.^{2 3} No estudo epidemiológico sobre leishmaniose visceral em Portugal, de Serrada *et al.*(2010), 29,5% dos infectados tinham como factor de risco de contágio a toxicofilia EV (factor de risco isolado com maior peso epidemiológico neste estudo).⁴ O reservatório da doença no meio ambiente é o cão, estando a infeção também descrita em raposas, felinos e roedores. Estimou-se em 2008, a existência 2.5 milhões de canídeos infetados nos territórios de Portugal, Espanha, Itália e França.⁵

A leishmaniose visceral é endémica em 60 países, registando-se cerca de 200 000 -400 000 novos casos por ano. Os dados apontam para uma prevalência global da infeção de 2 milhões de casos. Estima-se que a leishmaniose visceral esteja implicada anualmente em 20 000-30 000 óbitos. A incidência da doença é superior nos países em desenvolvimento, registando-se 80% do total de infeções em seis países: Brasil (no qual se verificam 96% das infeções da América do Sul), Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh, Índia e Etiópia. Apenas 5-7% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem nos países mediterrânicos.⁶ Em Portugal, entre 1999 e 2009, registaram-se 378 casos da doença que motivaram 730 internamentos durante este período.⁴ São fatores de risco para a doença a pobreza extrema, a imunodepressão (desnutrição; infeção por VIH; em contexto pós-transplante com instituição de terapêutica imunomoduladora; doença oncológica e reumatológica) e alterações ambientais, como catástrofes naturais e modificação progressiva dos ecossistemas (desflorestação).^{1 7}

A infeção parasitária é geralmente assintomática nos indivíduos imunocompetentes (estima-se que apenas um em cada dez indivíduos infetados venha a desenvolver sintomas). Os principais sintomas manifestados nos indivíduos

diagnosticados são febre intermitente, letargia, suores noturnos, perda de peso e palidez, registando-se com menor frequência a apresentação clínica através de diarreia e cefaleias. Os principais sinais observados são esplenomegalia, hepatomegália, adenopatias e com menor frequência, alterações cutâneas.^{4 8 9 10} Laboratorialmente, é frequente observar as alterações hematológicas de anemia, leucopenia e trombocitose (pancitopenia, quando combinadas, com uma ocorrência clínica de 74%, num estudo levado a cabo em Portugal).⁴ Nas formas mais severas da doença, sobretudo nos indivíduos imunodeprimidos pode ocorrer envolvimento renal, pulmonar, hemorragias significativas (decorrentes da trombocitopenia) e infeções por outros agentes (propiciadas pela leucopenia).¹ O diagnóstico definitivo da infeção requer a identificação do parasita numa amostra de medula óssea (sangue medular) ou em sangue periférico do doente. Apesar da baixa sensibilidade (cerca de 70%), a confirmação da infeção por exame microscópico de aspirado de medula óssea continua a ser utilizado devido á elevada especificidade e acessibilidade do método (o aspirado esplênico constitui uma amostra que, embora capaz de garantir melhores parâmetros pré-teste, é geralmente dispensada em detrimento do aspirado medular cuja obtenção é mais segura). A cultura do aspirado no meio de *Novy-McNeal-Nicolle* é um método diagnóstico que eleva a sensibilidade da avaliação, no entanto a obtenção de resultados demora cerca de quatro semanas. Estão disponíveis exames serológicos com protocolos que garantem cada vez melhores parâmetros de sensibilidade e especificidade, embora este método tenha a limitação dos títulos de anticorpos permanecerem positivos muito tempo após a resolução da infeção – ao contrário dos testes de antigénio urinário que rapidamente passam a acusar resultado negativo após a eliminação do parasita. A análise por PCR é um exame cada vez mais difundido nos países desenvolvidos, com excelente sensibilidade e especificidade.^{1 8 9 10 11}

A infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) está globalmente disseminada e constitui uma das principais causas de incapacidade e mortalidade na Africa Subsariana, Sudeste Asiático e América do Sul. Existem atualmente a nível global 36.9 milhões de indivíduos afetados e cerca de 2 milhões de novas infeções anuais.⁸ Em Portugal estima-se que existam 40 000 – 50 000 indivíduos infetados, o que corresponde a 0.4-0.6% no que respeita á prevalência da infeção. De notar que Portugal regista a maior taxa de incidência de infeção (205 novos casos por milhão de

habitantes) de entre os países ocidentais de Europa (média de 85 novos casos por milhão de habitantes).¹²

As infeções oportunistas continuam a ser a principal causa de morte nos indivíduos infetados com VIH na era da terapêutica antirretroviral de alta eficácia.¹³ A leishmaniose visceral tem sido reconhecida desde 1980 pela sua associação ao estado de imunodepressão condicionado pelo VIH nos estádios SIDA (embora a maioria dos casos de leishmaniose visceral associado á SIDA ocorra para contagens de células CD4 inferiores a 200 células/ml, está descrita a ocorrência de manifestações clínicas em indivíduos com contagens superiores).¹⁰ Apesar da associação á depleção da imunidade a leishmaniose visceral não é considerada como doença definidora de SIDA. Em 1998, 85% dos casos descritos de coinfeção LV/VIH verificaram-se em Portugal, Espanha, Itália e França.⁹ Entre 1999-2009 em Portugal continental, 48.8% doentes com leishmaniose visceral internados era portador do vírus da imunodeficiência humana ou apresentava a doença em estágio SIDA.⁴ De destacar ainda que, segundo o relatório da OMS de 1998, os dados relativos á epidemiologia indicavam que 71% dos doentes co-infectados nos países mediterrânicos tinham hábitos toxicofílicos, tendo esta sido considerada a principal via de transmissão de ambos os agentes (o ADN de *Leishmania infantum* pôde ser detetado em seringas de utilizadores de drogas endovenosas infetados).¹⁰

VIH e *Leishmania* partilham o mecanismo imunopatológico de replicação dentro do espaço celular, de linfócitos T-CD4+ e macrófagos respectivamente, reforçando-se mutuamente no contexto de coinfeção, conduzindo á neutralização progressiva destes constituintes do sistema imunitário. Em doentes infetados por VIH, a imunodepressão condicionada pelo vírus aumenta a probabilidade de reativação e tradução clínica de infeções por *L. infantum* e *L. donovani* (em áreas endémicas, a probabilidade de um indivíduo VIH-positivo vir a desenvolver leishmaniose visceral é 100 a 1000 vezes superior á de um indivíduo não seropositivo para o vírus). A leishmaniose pode promover a replicação viral e acelerar a progressão para os estádios SIDA, mesmo em indivíduos com esquemas TARV otimizados. A deriva para uma resposta específica tipo Th2 em doentes com disfunção de linfócitos T induzidos pelo VIH-1, também pode explicar a gravidade da leishmaniose visceral e as manifestações atípicas observadas em alguns neste grupo de doentes (cutâneas, pulmonares, orais, gastrointestinais e renais). A coinfeção por VIH tem sido consistentemente associada a menores taxas de cura

clínica e laboratorial da infecção por *L. infantum* e *L. donovani* (persistência de atividade parasitológica), maior número de re-internamentos por re-infecção e/ou reativação da infecção parasitária (a resposta clínica aos fármacos disponíveis geralmente piora a cada reativação), maior número de complicações iatrogénicas e finalmente maior mortalidade e menor sobrevida.¹ Desta forma, urge encontrar esquemas terapêuticos e profiláticos mais eficazes neste contexto clínico.

Apesar da investigação clínica levada a cabo recentemente no campo do tratamento de indivíduos co-infetados, não há consenso geral sobre o fármaco de escolha, dose, duração ou sobre a eficácia em terapias combinadas ou esquemas preferenciais de profilaxia secundária. Atualmente, a OMS recomenda a anfotericina B lipossômica como a primeira opção devido ao seu perfil de segurança e elevadas taxas de cura clínica (Tabela 1). Os principais esquemas utilizados consistem num esquema de indução de 5-10 dias na dose de 3-5 mg/kg/dia (existe a preocupação de evitar uma dose total superior a 40mg/kg indutiva, a fim de evitar a toxicidade renal associada ao tratamento). Consoante os estudos realizados, registaram-se taxas de resposta inicial que variaram entre os 37% e 90% (Tabela 2). A falência terapêutica inicial e mortalidade em monoterapia em doentes co-infetados é potenciada em casos em que se registaram várias recaídas e a realizar esquemas com dose total baixa e realizados por curtos períodos de tempo. No estudo de Laguna *et al.* O esquema de 10 dias/ 3mg/kg/dia mostrou-se superior na prevenção de recaídas (38%) que ocorreram numa taxa consideravelmente inferior ao grupo que realizou o esquema de 5 dias 3mg/kg/dia (50%).

Tabela 8- *Guidelines* de Tratamento e Terapia Antiretroviral (TARV) de acordo com as indicações da Organização Mundial de Saúde (OMS), Médicos sem Fronteiras (MSF; adaptado ao Sudão, Sudão do Sul e Etiópia). A TARV é indicada em todos os doentes.

Guideline	Tratamento 1º linha	Tratamento 2º linha
OMS (2010)	Anfotericina B lipossómica 3–5 mg/kg/dia distribuído por 5 dias seguidos + 1 toma semanal durante 5 semanas	Derivados do antimónio (em áreas sem altas taxas de resistência)
MSF no Sudão, Sudão do Sul e Etiópia (2012)	Anfotericina B lipossómica 5 mg/kg/dia distribuído por 6 dias alternados + miltefosina 100 mg/dia (dividido em duas doses diárias de 50 mg) durante 28 dias	Derivados do antimónio na dose de 20 mg/kg/dia durante 30 dias + paromomicina na dose de 15 mg/kg/dia durante 17 dias
MSF na Etiópia (2013)	Anfotericina B lipossómica na dose total de 40 mg/kg; 3–5 mg/kg/dia, 5 dias seguidos + 1 toma semanal durante 5 semanas	Derivados do antimónio

Tabela 9- Principais estudos/ensaios sobre tratamento da Leishmaniose Visceral em doentes coinfectados com *VIH*.

Estudo/Autor	População/Design	Braços do estudo; N	Resposta inicial	Mortalidade	Falência terapêutica Inicial/ Recidiva	Tolerância
Laguna et al ^{14 15}	Ensaio clínico randomizado, prospectivo e comparativo; Espanha (1999-2003)	Grupo1: Estibogluconato de sódio 20 mg/kg/dia - 20 dias; N=19	33%	Não avaliado	57% recidivaram	4 mortes por pancreatite iatrogénica + 2 mortes por IRA iatrogénica
		Grupo2: Anfotericina B lipossômica na dose de 3mg/kg/dia – 5 dias; N=18	37%	Não avaliado	50% recidivaram	7 casos de reações infusionais autolimitadas; 1 caso de IRA que reverteu com suspensão
		Grupo 3: Anfotericina B lipossômica na dose de				Oito casos de reação

		3mg/kg/dia – 10 dias N=20	42%	Não avaliado	38% recidivaram	infusional autolimitados.
Ritmeijer K, et al. ¹⁶	Estudo Retrospectivo; Etiópia(2007- 2009)	Anfotericina B lipossômica em dose total de 3 mg/Kg/dia – 10 dias. N=195, dos quais	59,5%	6,7%	32,2% fal.inicial	Não avaliado
		116 VL primária	74,1%	7,8%	16,4% fal. inicial	Não avaliado
		79 VL recidivante	38,0%	5,1%	55,7% fal.inicial	Não avaliado
Ritmeijer K, et al. ¹⁷	Estudo Retrospectivo; Etiópia (2010- 2013)	Anfotericina B lipossômica em dose total de 3mg/Kg/dia – 10 dias + Miltefosina em dose de 100mg – 28 dias; N=111	81,1%	9%	Não avaliado	Não avaliado

Russo et al. ¹⁸	Estudo Retrospectivo; Itália, Espanha e Portugal (2014)	Anfotericina B lipossômica na dose de 4mg/kg/dia – 10 dias.-); N=10	90%	Não avaliado	100% recidivaram	Sem reações adversas registadas.
Ritmeijer K. et al. ¹⁹	Ensaio clínico randomizado; prospectivo; Índia (2006)	Grupo1: Miltefosina 100mg/dia – 28 dias; N=63	89%	Não avaliado	31% recidivaram	41 casos de vômitos e 34 de diarreia
		Grupo2: Estibogluconato de sódio 20 mg/kg/dia 40-60 dias; N=44	90%	Não avaliado	14% recidivaram	20 casos de vômitos e 32 de diarreia
Sinderman H. et. Al. ²⁰	Estudo retrospectivo; Índia (2004)	Miltefosina 100mg/dia – 28 dias; N=39	64%	Não avaliado	88% recidivaram	10 casos de vômitos, 4 casos de diarreia
Haillu W. et al. ²¹	Estudo retrospectivo; Etiópia (2010)	Antimoniato de Meglumina na dose de 20 mg/kg/dia – 30 dias; N=12	58,3%	Não avaliado	66,7% recidivaram nos primeiros 6 meses	Não avaliado

Diro et al. ²²	Estudo prospectivo; Etiópia (2013)	Estibogluconato de Sódio na dose de 20 mg/kg/dia – 30 dias; N=53	43,4%	11,3%	30,2% de falência inicial	5,7% pararam terapia por reações adversas
----------------------------------	---	---	-------	-------	---------------------------	---

Os derivados do antimónio foram testados nas últimas duas décadas e têm eficácia que varia entre 33-90%.²³ Embora as taxas de resposta sejam comparáveis ou apenas ligeiramente inferiores às registadas no tratamento com as fórmulas de anfotericina, a toxicidade destes fármacos é marcadamente superior (taxas de abandono de tratamento permanente ou temporária de 5,7% foram registados em estudo na Etiópia). A diarreia e os vómitos ocorrem numa grande percentagem de doentes, condicionando a adesão ao tratamento. A pancreatite iatrogénica é a reação adversa mais letal, tendo-se verificado em 4 dos 18 doentes em que foi instituída terapêutica com estibogluconato de sódio no estudo de Laguna *et al.* Além disso, a utilização desta classe de fármacos em indivíduos co-infetados resultou numa taxa de mortalidade 4 a 10 vezes superior em comparação com os resultados obtidos em indivíduos VIH-negativos. Verifica-se uma alta taxa de recaída (no estudo realizado por Haillu W., dois terços dos doentes tratados com antimonio de meglumina recidivaram nos primeiros 6 meses) Os derivados do antimónio são presentemente considerados apenas como opções farmacológicas de segunda linha.²⁴ A sua utilização continua a ser ampla na África oriental, dado o seu baixo preço.

A experiência com a miltefosina não é tão rica em casuística e, embora a cura inicial seja atingida numa elevada percentagem de doentes (64%-89%), quase todos recaíram no *follow-up* (88% no estudo de Sinderman H.). Este fármaco tem a vantagem de permitir formulação oral a preços cada vez mais baixos.²⁵

A terapia combinada tem vindo a ser sugerida e implementada em doentes coinfectados com LV / VIH com múltiplas recidivas, com o intuito de resolução da infeção ativa, diminuição do número de recaídas e diminuição dos casos de resistência

(existe um número crescente de casos de resistência aos derivados do antimónio no subcontinente indiano; a longa semi-vida da miltefosina gera preocupação relativa á sua potencial maior susceptibilidade enquanto alvo de resistência). Pensa-se que a conjugação de fármacos permite a redução de doses e duração do tratamento e assim reduzir a toxicidade farmacológica e os gastos económicos nos sistemas de saúde.²⁶ A utilização recente de esquemas combinados de anfotericina B lipossómica e miltefosina na Índia e este de África foi associada a uma substancialmente maior taxa de cura clínica e menor número de recaídas, quando comparada com a utilização de anfotericina B lipossómica em monoterapia. No estudo retrospectivo realizado por Ritmeijer K. com 111 doentes (anfotericina B lipossómica em dose total de 30mg/Kg + miltefosina em dose de 100mg – 28 dias), registou-se uma resposta inicial de 89%²⁷.

Casos isolados de regimes de combinação com pentamidina e fluconazol, miltefosina e estibogluconato de sódio, alopurinol e antimoniato de meglumina foram publicados com bons resultados embora com casuística insuficiente para estabelecer recomendações firmes^{28 29}.

A profilaxia secundária com vista á eviçãõ da recaída em casos coinfeccão LV/VIH são recomendados pelas *guidelines* internacionais. Existem dados acumulados suficientes sobre os benefícios da terapia de manutenção em pacientes co-infectados, embora estes sejam baseados estudos não aleatorizados ou sem grupo de controle. Nestes trabalhos, os doentes que não realizaram profilaxia tenderam a ter uma infeccão mais grave ou recidivaram mais frequentemente (a taxa de recidiva calculada em doentes que não realizaram profilaxia secundária após resposta inicial varia entre 50 e 100%). No único estudo prospectivo e aleatorizado para investigar a eficácia de uma terapia de manutenção, a anfotericina B lipossómica (na dose de 3 mg/kg a cada 21 dias) foi comparado com um grupo de controlo que não realizou profilaxia secundária. Aos 12 meses de follow-up, o benefício da terapia de manutenção foi evidente na análise de intenção de tratar. A probabilidade de estar livre de doença aos 12 meses foi de 50% e 22% para os grupos com e sem terapia de manutenção, respectivamente.³⁰ Uma meta-análise que incluiu 1.017 pacientes co-infectados relatou que a profilaxia secundária reduz significativamente a taxa de recidiva de LV (OR 0,228).³¹ Diferentes esquemas têm sido usados, principalmente com derivados do antimónio (20 mg/kg/dia, administrados a cada 3 a 4 semanas), anfotericina B lipossómica (3 a 5 mg/kg/dia a cada 3 a 4 semanas), ou pentamidina (4 mg/kg/dia [300 mg no adulto], administrada a cada 3

a 4 semanas). No entanto, existem dados escassos em relação á formulação, dose e esquema em que deve ser administrado o fármaco. Noutro estudo prospetivo, foi avaliada a eficácia da terapia de manutenção com o mesmo fármaco, desta feita num esquema fixo de 4 mg/kg/dia durante cinco dias na primeira semana e, em seguida, uma vez por semana durante mais cinco semanas (total de 10 doses). Até 80% dos pacientes foram relatados como isentos de doença após um seguimento de 12 meses. Os derivados pentavalentes do antimónio também foram avaliados como terapia de manutenção administrada a cada 3-4 semanas. A taxa de recaída diminuiu mais significativamente no grupo de intervenção do que nos pacientes que não receberam nenhum tratamento (ou receberam alopurinol como profilaxia secundária), após um seguimento de 23 meses.³² Em Portugal, a miltefosina foi administrada como terapia de manutenção em três doentes por 21, 14 e 12 meses, respectivamente. Os pacientes permaneceram livres de recaída por um período médio de 20 meses. Os autores concluíram que a miltefosina pode ser um fármaco eficaz para a profilaxia devido à sua meia-vida longa e à sua administração oral.³³

Tabela 10- Principais estudos/ensaio sobre a profilaxia secundária da recaída da Leishmaniose Visceral em doentes co-infectados com *VIH*.

Estudo/Autor	População/N	Fármaco/Esquema	Outcome
Lopes-Velez et al. ³²	N=17, Espanha	Grupo1: Anfotericina B lipossómica na dose de 3 mg/kg/dia a cada 21 dias (n=8); Grupo2: Sem profilaxia secundária (n=9)	Grupo1: 50% livre de recidiva vs Grupo2: 22% livre de recidiva, após 1 ano de follow-up.
Molina et al ³²	N=17, Espanha	Todos os doentes estudados receberam Anfotericina B lipossómica na dose 4 mg/kg/dia semanalmente, durante 5 semanas após tratamento de indução	A probabilidade de estar livre de recidiva foi de 89.7%, 79.1% e 55.9% aos 6, 12 e 36 meses, respectivamente.

Marques et al. ³³	N=5, Portugal	Todos os doentes receberam dose trissemanal de 50 mg de Miltefosina	O tratamento foi administrado até ser atingido status imunitário de 250 CD4/mm3 durante um mínimo de 12 meses. Nenhum dos participantes do estudo recaiu no período de follow-up
Ribera et al. ³⁴	N=46, Espanha	Grupo1: Não realizou tratamento profilático(n=20); Grupo2: Alopurinol 300 mg/8 h oral (n=9); Grupo3: Derivados pentavalentes do antimónio na dose de 850 mg (parenteral)/mês (n=17)	Os participantes foram seguidos até recaída. 35%, 44% e 85% dos grupos 1,2 e 3 respectivamente não recaíram durante o follow up (12 meses).
Goswami et al. ³⁵	N=51, India	Grupo1: Não realizou tratamento profilático (n=24); Grupo2: Realizou tratamento com Anfotericina B lipossómica 4 mg/kg/dose semanalmente(n=15) ou Anfotericina desoxicolato na dose de 1 mg/kg/dia durante um ano (n=12).	Durante o follow-up apenas 25% dos doentes do Grupo1 não recidivou. Nenhum dos doentes do Grupo2 recidivou
Diro et al. ³⁶	N=74, Etiópia	Todos os doentes receberam tratamento	A probabilidade de estar livre de recidiva aos 6 e 12 meses foi

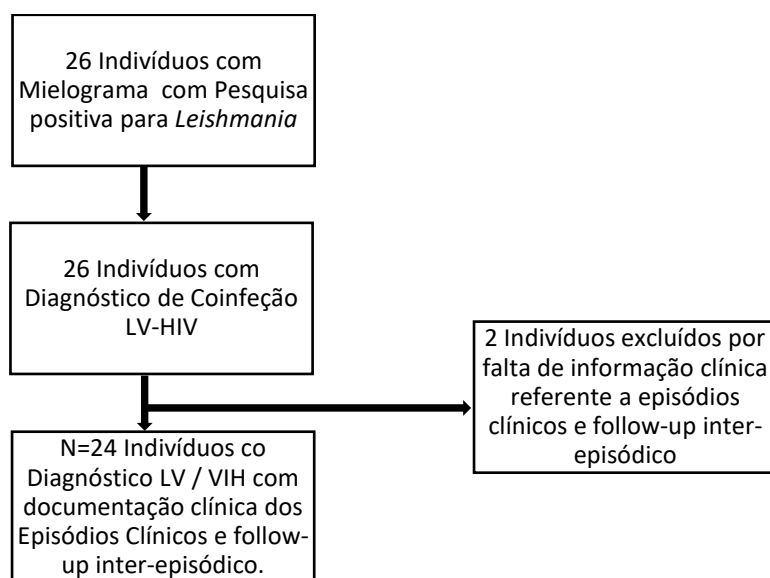
		mensal com pentamidina 4 mg/kg/dia durante um ano	de 79% e 71%, respectivamente.
--	--	---	--------------------------------

Ao fim de determinar a experiência acumulada referente ao tratamento de leishmaniose visceral no contexto de infecção por VIH foram analisados todos os casos de leishmaniose visceral confirmados por mielograma e coinfectados por VIH entre 2000 e 2017 no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria. O objetivo principal foi investigar a eficácia da terapêutica e da profilaxia instituída pela determinação de número de recidivas e sobrevida. Os objetivo secundário foi a caracterização epidemiológica e clínica da população(faixa etária e género, meio de contágio, estado imunológico na apresentação clínica, adesão á ART, comorbilidades).

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional no qual foram incluídos todos os doentes com pesquisa de *Leishmania* positiva em mielograma entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2017. Todos os doentes com pesquisa de *Leishmania* positiva revelaram-se co-infectados por VIH. Foram considerados unidades doente/episódio clínico passíveis de inclusão no estudo os casos com mielograma positivo para pesquisa de leishmania e clínica sugestiva. Dos 26 doentes identificados, dois foram excluídos por documentação clínica insuficiente. A análise insere-se numa coleção de dados anonimizados fornecidos pelo orientador. A melhoria clínica e laboratorial foram os critérios considerados para declarar um doente sem leishmaniose visceral ativa e passível de instituição de profilaxia. As principais variáveis pesquisadas/estudadas foram as seguintes: idade, género, comorbilidades, data de diagnóstico de VIH/ anos vividos com HIV positivo até ao episódio de LV, contagem de células T CD4+ no episódio clínico, relação entre contagens de células T CD4+ e T CD8+ no episódio clínico, nadir de células T CD4+, níveis plasmáticos de ARN do HIV (cópias virais), uso de terapia anti-retroviral (TARV), presença ou ausência sinais e sintomas e anormalidades laboratoriais selecionados, esquema de tratamento LV, esquema de profilaxia LV, tempo até recaída, tempo de sobrevida. A base de dados do estudo e o estudo estatístico descritivo foram realizados com recurso a Microsoft Excel 2017. A abordagem estatística analítica foi realizada com recurso a SPSS. Realizaram-se testes estatísticos T Student (variáveis independentes, assumidas variâncias iguais) e Chi-quadrado de Pearson (teste de homogeneidade), onde aplicável. A significância estatística foi atribuída a valores de $p < 0,05$.

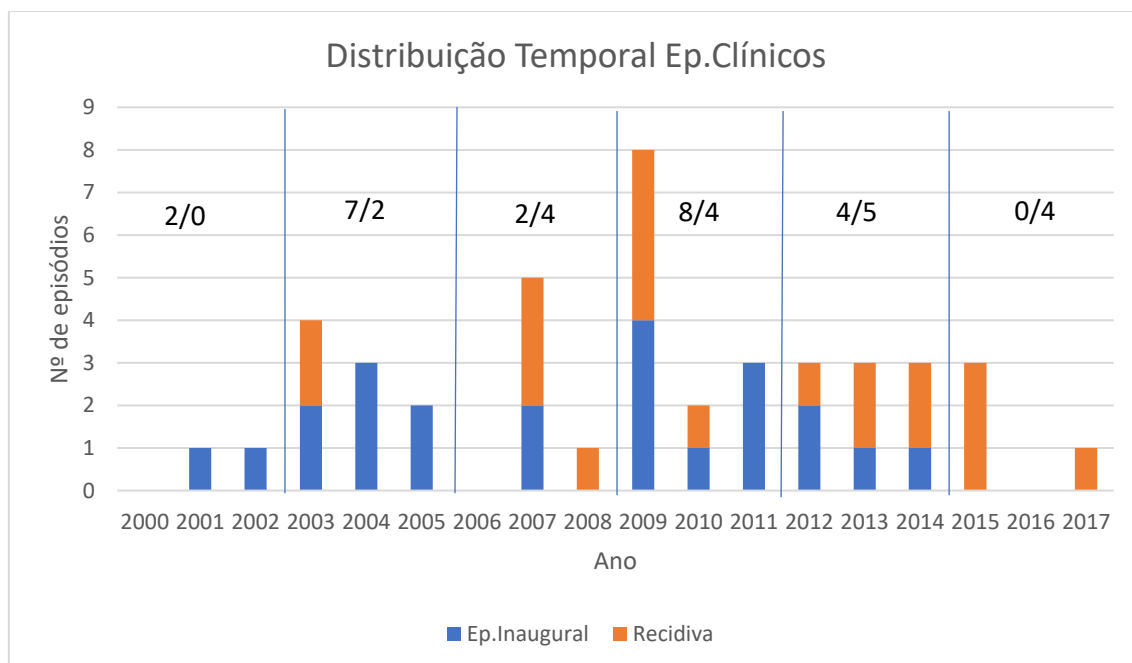
Figura 2- Diagrama de fluxo indicativo do processo de seleção da população estudada



RESULTADOS

Foram identificados 24 indivíduos com VIH e leishmaniose visceral. Estes indivíduos somaram um total de 44 episódios clínicos, considerando episódios iniciais e recidivas (todos confirmados por pesquisa de parasita em aspirado medular) admitidos para tratamento em Hospital de Dia ou Internamento do Serviço de Doenças Infecciosas do HSM. O número de episódios clínicos por indivíduo varia entre 1 e 7, tendo estes episódios ocorrido entre 1 de Janeiro do ano 2000 e 31 de Dezembro do ano de 2017.

Gráfico 4 - Distribuição temporal dos episódios clínicos estudados (o tempo total de estudo foi dividido em períodos de três anos, sendo contabilizada a relação primeiros episódios/episódios recidivantes em cada um destes períodos)



Com a exceção de um indivíduo, todos os restantes admitidos no estudo são do sexo masculino. A idade dos doentes no primeiro episódio clínico varia entre os 25 e os 55 anos, sendo a média das idades no episódio inaugural de 39,3 anos. Em quatro casos, ocorreu o diagnóstico inaugural de VIH em simultâneo com o primeiro episódio clínico de leishmaniose visceral. O intervalo de tempo médio entre o diagnóstico de VIH e a

ocorrência do primeiro episódio de leishmaniose visceral foi de 6,8 anos. O tempo médio de seguimento por indivíduo foram 53,6 meses. Uma percentagem de 52,3% (23/44) dos episódios clínicos de leishmaniose visceral ocorreu em indivíduos a cumprir esquema TARV. Quatro destes 23 indivíduos que estavam a realizar TARV antes do episódio clínico tinham cargas virais indetetáveis. A contagem média de cópias virais detetada aquando de cada diagnóstico de leishmaniose foi de 330 332 cópias/ml (verificando-se uma média de 339 330 cópias virais nos episódios inaugurais e 321 246 cópias virais nos episódios recidivantes). A contagem sérica média de células CD4+ registada nos 44 episódios clínicos considerados foi de 69 células/ μ L (verificando-se uma concentração sérica média de 65 células/ μ L nos episódios iniciais versus uma média de 75 células/ μ L nos episódios recidivantes). A relação sérica entre a contagem de células CD4+ e células CD8+ no momento dos episódios clínicos estudados teve um valor médio de 0,28 (verificando-se uma razão entre os tipos celulares citados de 0,21 em episódios iniciais e de 0,37 em episódios recidivantes). Verificou-se que nos episódios clínicos em que os indivíduos estavam a cumprir esquema TARV a média de células CD4+ (86 versus 53; $p = 0,044$) e a relação entre os tipos celulares CD4+/CD8+ (0,42 versus 0,16; $p\text{-value}=0,006$) foram significativamente superiores, enquanto a carga viral foi significativamente inferior (104 497 vs 556 078; $p\text{-value}=0,001$)

Tabela 11 - Características demográficas/clínicas da população estudada

Características demográficas/clínicas	População (N=24)
Sexo	
Masculino	23 (95,8%)
Feminino	1 (4,2%)
Idade 1º Episódio clínico	
Média	39,3 anos
Mín	25 anos
Máx	55 anos
Diagnóstico prévio VIH	
Sim	20 (83,3%)
Não	4 (16,7%)
Tempo médio com diagnóstico VIH até 1º Ep. Clínico LV	6,8 anos

Tabela 12 - Perfil imunológico da população estudada aquando do 1º Episódio clínico e Episódios recidivantes.

Perfil imunológico 1º Episódio	N=24	Perfil imunológico episódio rec.	N=20	P-value
Média CV 1º episódio	339 330 cv/ml	CV episódio rec.	321 246 cv/ml	NS
Mín	0	Mín	0	
Máx	864 500 cv/ml	Máx	1 600 000 cv/ml	
Média CD4+ 1º episódio	65 células/ul	CD4+ episódio rec.	75 células/ul	NS
Mín	4 células/ul	Mín	15 células/ul	
Máx	228 células/ul	Máx	235 células/ul	
Rel CD4+/CD8+ 1º episódio	0,21	Rel CD4+/CD8+ episódio rec.	0,39	NS
Mín	0,005	Mín	0,04	
Máx	0,7	Máx	1,4	

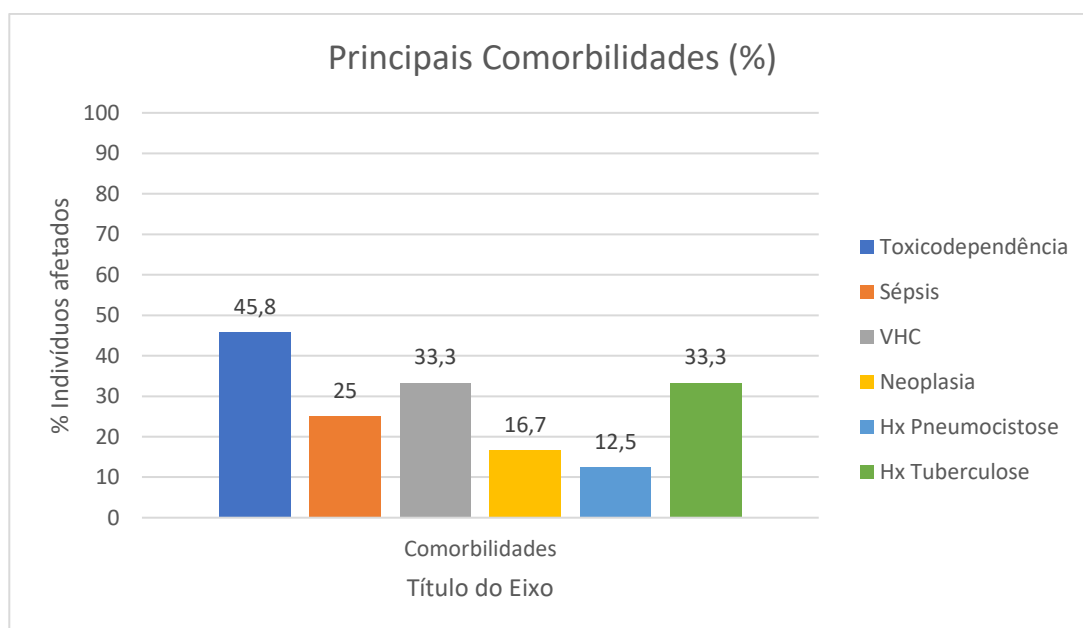
Tabela 13 - Perfil imunológico da população estudada nos Episódios ocorridos na vigência e sem TARV.

Perfil imunológico Episódios sob TARV	N=23	Perfil imunológico Episódios sem TARV	N=21	P-value
Média CV sob TARV	104 497 cv/ml	CV episódio rec.	556 078cv/ml	0,001
Mín	0	Mín	57 789 cv/ml	
Máx	864 500 cv/ml	Máx	1 600 000 cv/ml	

Média CD4+ sob TARV	86 células/ul	CD4+ episódio sem TARV	53 células/ul	0,044
Mín	5 células/ul	Mín	4 células/ml	
Máx	235 células/ul	Máx	228 células/ml	
Rel CD4+/CD8+ sob TARV	0,42	Rel CD4+/CD8+ em TARV	0,16	0,006
Mín	0,005	Mín	0,007	
Máx	1,4	Máx	0,5	

No que toca às comorbilidades, 45,8% dos indivíduos possuía história ou toxicodependência com drogas injectáveis na forma ativa (11/24), 33,3% história de tuberculose pulmonar ou miliar (8/24), 33,3% infeção pelo vírus da hepatite C (8/24), 25% (6 dos 24 indivíduos) desenvolveram pelo menos uma infeção com critérios de sépsis durante o seguimento, 16,7% (4 dos 24 indivíduos) diagnóstico de neoplasia (2 casos de sarcoma de Kaposi, um caso de carcinoma espino-celular da pele e um caso de adenocarcinoma gástrico) e 12,5% (3 dos 24 indivíduos) história de pneumocistose. A ocorrência de sépsis (6 em 24 dos indivíduos, 25%) correlacionou-se positivamente com uma probabilidade aumentada de desfecho fatal no primeiro episódio ($p=0,003$) – todos os indivíduos com infeção séptica documentada faleceram durante o tempo de estudo. Apenas 1 dos 11 indivíduos toxicofílicos incluídos no estudo não faleceu durante o tempo de seguimento. Dos 8 indivíduos com história de tuberculose, metade faleceu durante o tempo de estudo.

Gráfico 5 - Principais comorbilidades reportadas na população estudada



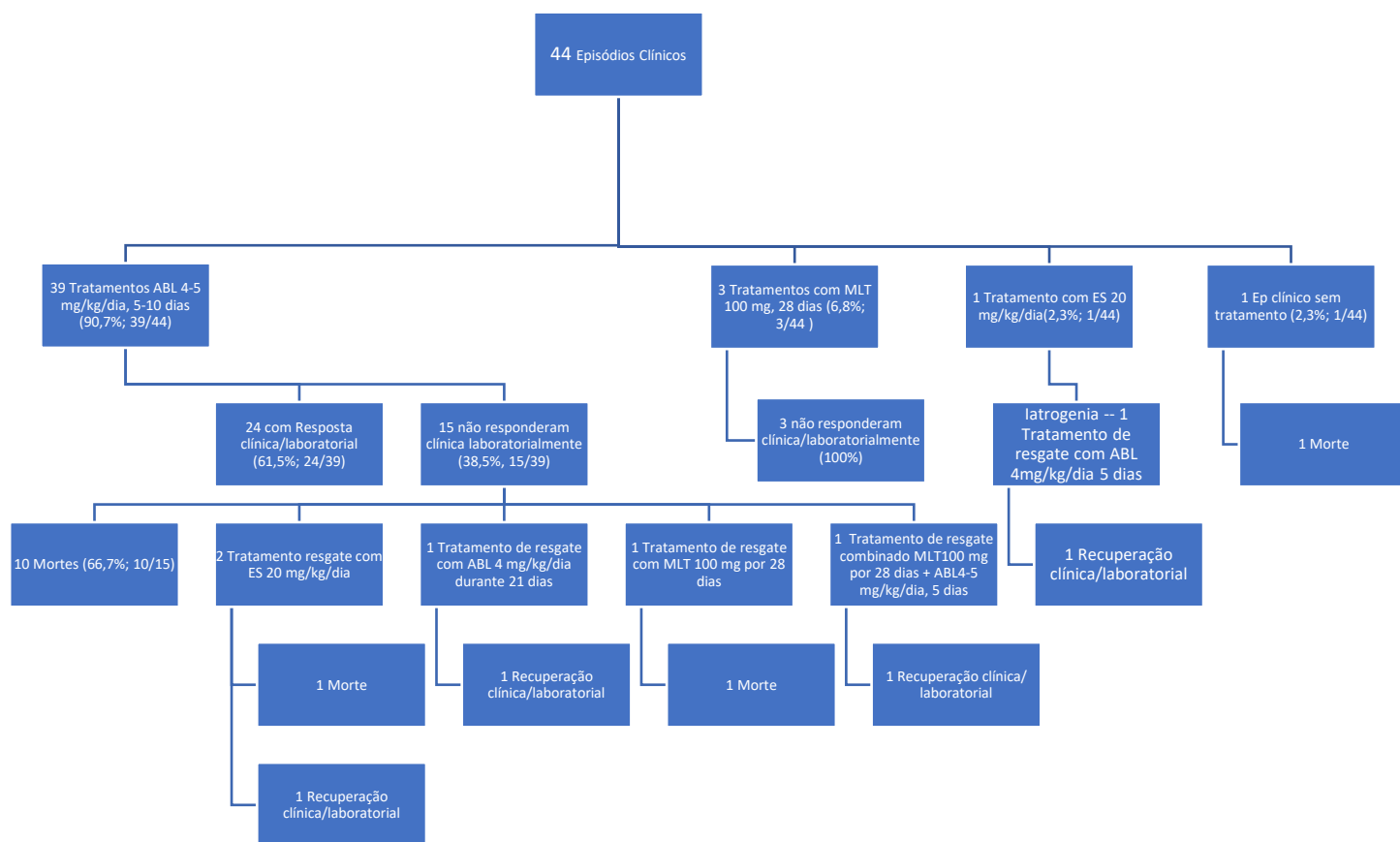
A perda ponderal foi sintoma de apresentação em 72,73% dos episódios clínicos (ocorreu em 32 dos 44 episódios considerados). A apresentação clínica no episódio inicial com perda ponderal correlacionou-se positivamente com desfecho fatal ($p=0,046$). A ocorrência de febre foi reportada em 50% dos casos (22 do total de 44 casos). Alterações das linhagens eritropoéticas ocorreram em todas as admissões, sendo detetada pancitopenia em 95% dos casos (42 dos 44 episódios clínicos) e bicitopénia (anemia combinada com trombocitopénia) nos restantes dois casos (4,55%). A deteção de organomegalias ocorreu em todos os casos com exceção de um. A hepatoesplenomegália foi um sinal detetado em 40 dos episódios clínicos (91%), ao passo que a esplenomegália isolada verificou-se em três casos. A hipergamaglobulinémia foi uma alteração ocorrida em 19 dos 44 episódios clínicos (43%). Os episódios clínicos em que foi detetada esta alteração analítica associaram-se a cargas virais séricas na admissão maiores (527 141 vs 133 434; $p\text{-value}=0,007$).

Tabela 14 - Apresentação clínica dos episódios de leishmaniose visceral estudados.

Apresentação Clínica	Ep Clínicos; N=44
Febre	
Sim	23 (52%)
Não	21 (48%)
Organomegália	
Hepatoesplenomegália	40 (91%)
Esplenomegália	3
Não	1
Hipergamaglobulinémia	
Sim	19 (43%)
Não	25 (57%)
Perda ponderal	
Sim	32 (73%)
Não	12 (27%)
Pancitopénia	
Sim	42 (95%)
Bicitopénia	2

Dos 44 episódios clínicos admitidos no estudo, em apenas uma das ocasiões houve um indivíduo não sujeito a terapêutica (degradação severa do estado clínico por outras comorbilidades, tornando fútil a instituição de terapêutica em doente terminal). Em 39 das 44 admissões clínicas (91%) foi instituída terapêutica com anfotericina B

Figura 3 - Terapêutica realizada e desfecho clínico dos episódios estudados. [ABL-Anfotericina B lipossômica; MLT- Miltefosina;ES- Estibogluconato de sódio



lipossômica IV em dose entre 4-5mg/Kg/dose em esquemas de indução de 5-10 dias seguidos de esquemas de manutenção com a mesma dose de fármaco em regime semanal entre 4 a 6 semanas. O tratamento com anfotericina B lipossômica resultou em recuperação clínica e laboratorial em 24 dos 39 casos (62%) em que este esquema foi instituído. Nos casos em que não houve resposta clínica e laboratorial significativas a este tratamento (15 em 39 dos casos, 38%), em 10 dos casos os doentes vieram a falecer. Nos restantes 5 casos em que não se verificou resposta inicial ao esquema de anfotericina B lipossômica, em dois casos foi instituída com estibogluconato de sódio (sendo que um dos doentes recuperou e o outro faleceu), em um caso foi instituída terapêutica com miltefosina (sem resposta, o doente faleceu), noutro caso nova terapêutica com anfotericina B num esquema de indução mais longo, de 21 dias

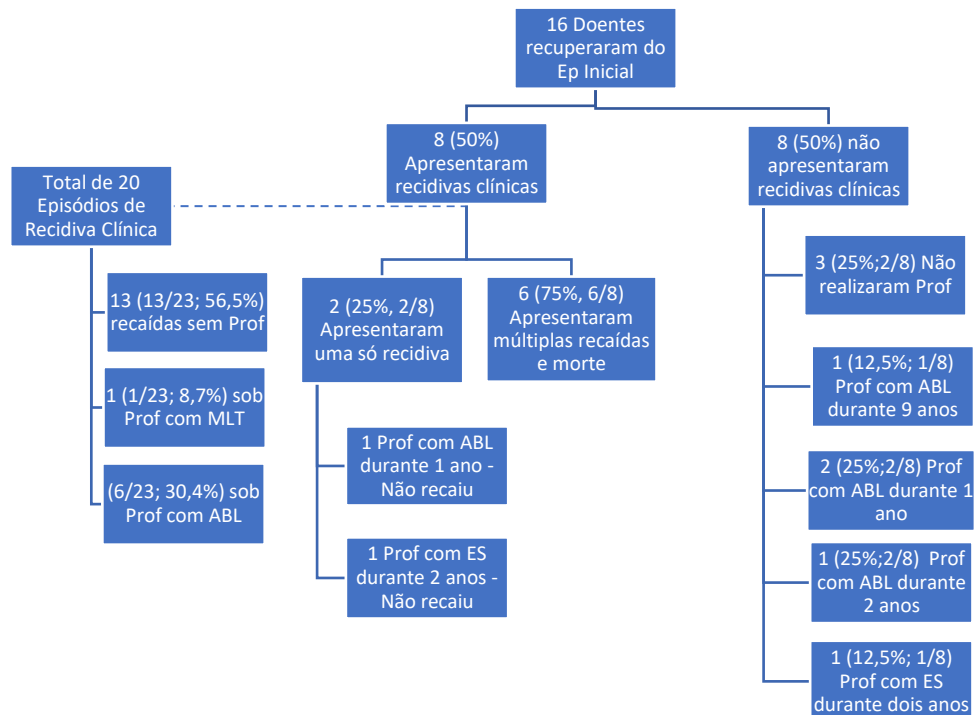
(registrou-se recuperação clínica e laboratorial neste caso) e por fim houve um caso tratado com terapêutica combinada de anfotericina B e miltefosina também com bons resultados.

Em 3 da totalidade dos episódios clínicos foi instituída como primeira terapêutica miltefosina na dose de 100mg/dia por via oral. Em todos os casos registou-se uma resposta parcial inicial (recuperação sintomática, mas manutenção de pancitopénia) e um padrão de recidiva precoce. Apenas num dos casos a primeira terapêutica estabelecida foi com estibogluconato de sódio 20 mg/kg/dia que despoletou como efeito adverso um quadro de pancreatite iatrogénica que obrigou á substituição terapêutica por anfotericina B com resposta completa.

Contando que oito dos indivíduos em estudo faleceram no primeiro episódio, foi estudado o impacto da terapia profilática nos restantes 16. Em metade (8 doentes, 50%) verificaram-se uma ou múltiplas recidivas clínicas. Em dois destes doentes (2 em 8, 25%) ocorreu apenas um episódio de recidiva tendo os doentes ficado livres de nova recaída após terapêutica profilática, num caso com anfotericina B lipossómica durante um ano e noutro com estibogluconato de sódio durante dois anos. Nos restantes seis doentes com recidivas clínicas (75%) estas somaram um total de 18 episódios recidivantes que conduziram direta ou indiretamente á morte (o total de recidivas estudadas é portanto 20, contando com os dois doentes que recidivaram apenas uma vez). Em 13 deste total de 20 recidivas clínicas os doentes não realizaram profilaxia secundária após o esquema terapêutico inicial, ao passo que em seis dos casos a instituição de profilaxia com anfotericina B durante um ano não foi suficiente para prevenir a recaída. Houve ainda um caso de falência profilática e recidiva subsequente num doente a realizar um esquema diário de miltefosina na dose 100mg até ao novo internamento. Nos casos em que não se verificou recidiva alguma após o tratamento da infeção inicial, em 62,5% realizou-se profilaxia eficaz (em 5 dos 8 doentes que nunca recidivaram). Os esquemas realizados foram com anfotericina B durante um ano num caso, durante dois anos em dois casos e durante nove anos em um caso. Estibogluconato de sódio durante dois anos foi eficaz num caso. Em três dos oito doentes que nunca recidivaram (37,5%) não foi instituída qualquer terapêutica profilática. Assim, a eficácia da profilaxia (com qualquer um dos fármacos utilizados e em qualquer dos esquemas

praticados) na prevenção de nova recaída foi de 50% (em 7 dos 14 casos em que foi instituída profilaxia após tratamento inicial não ocorreu nova recaída) contra apenas 19% de probabilidade de não sofrer nova recaída em casos em que não houve instituição de profilaxia (apenas em 3 dos 16 casos em que não houve profilaxia não se registou recidiva clínica). Quanto aos fármacos utilizados na quimioprofilaxia, a anfotericina B registou uma eficácia de 45% na prevenção de novos episódios (5 em 11 dos casos com este tratamento não desenvolveram recidiva subsequente); o estibogluconato de sódio conseguiu prevenir recidiva em ambos os casos em que foi utilizado como profilaxia secundária (as duas utilizações do fármaco na vertente profilática preveniram nova recidiva; embora sem significância estatística testável em comparação com tratamento com anfotericina B lipossómica, dado o baixo número de casos tratados com este derivado do antimónio); ao passo que a miltefosina não teve eficácia no único caso em que foi utilizada como profilaxia.

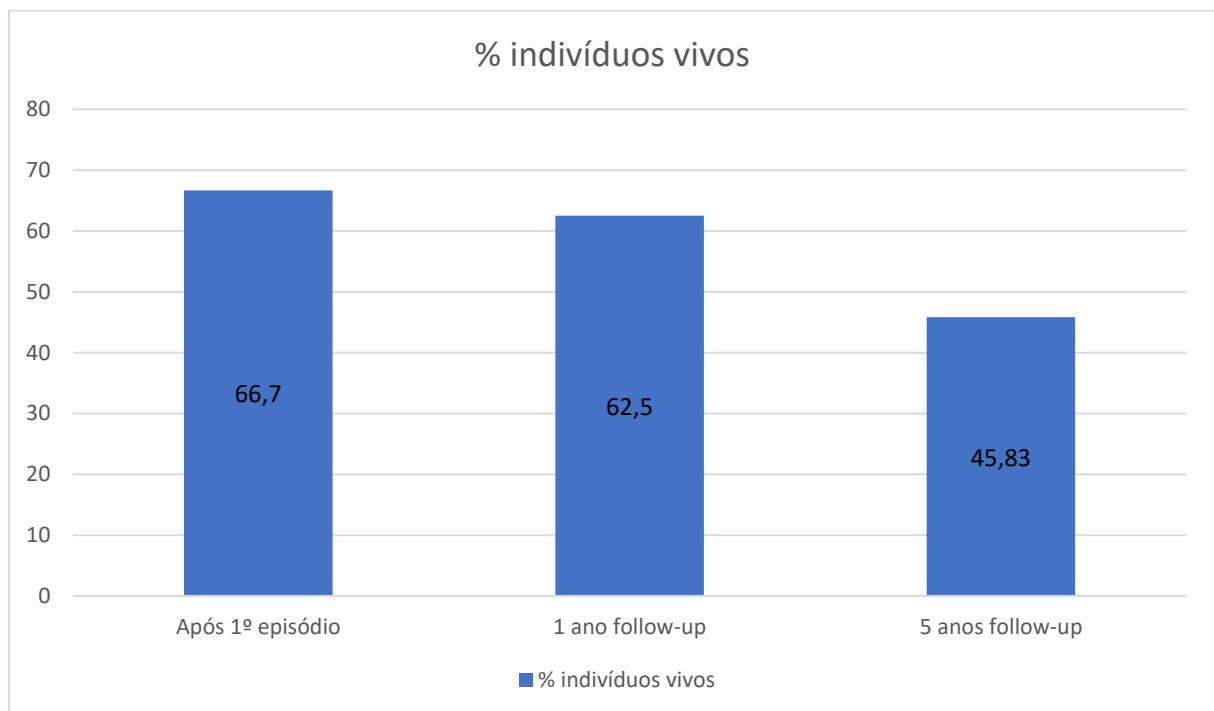
Figura 4 - Profilaxia secundária realizada e desfecho clínico [ABL- Anfotericina B Lipossómica; ES-Estibogluconato de sódio; MLT- Miltefosina; Prof- Profilaxia]



Entre os indivíduos que sofreram recidiva clínica, a média do número de recidivas clínicas sofridas por doente foi de 2,9. O tempo médio até recaída em 20 recidivas clínicas estudadas foi de 11,5 meses, verificando-se um desvio padrão de 7,2 meses. Os períodos de tempo mínimo e máximo entre recuperação clínica e recidiva foram respectivamente 3 e 28 meses. Relativamente ao impacto da instituição de profilaxia na duração do período livre de doença (nestes casos em que se verificou recidiva), a média de tempo até recidiva no grupo com profilaxia foi de 16,8 meses, enquanto no grupo sem profilaxia foi de 9,7 meses. Dos 20 episódios de recidiva, apenas seis não ocorreram em indivíduos toxicodependentes (70% dos episódios de recidiva clínica ocorreram em indivíduos dependentes de drogas injetáveis). O tempo que decorreu até recidiva clínica na subpopulação toxicodependente foi de 10,6 meses e na população não toxicodependente foi de 13,7 meses.

Em Dezembro de 2017 (limite do período abarcado pelo estudo), 37,5% dos doentes encontram-se vivos (correspondendo a 9 dos 24 doentes abarcados pelo estudo). Um terço dos indivíduos faleceram no decorrer do primeiro episódio clínico (8/24, 33,%), sendo que a sobrevida registada a um ano após início do quadro de leishmaniose visceral foi de 63% (sobreviveram após um ano de doença, 15 em 24 dos indivíduos totais). A sobrevida registada a 5 anos foi de 46% (estando vivos 11 dos 24 indivíduos). O tempo médio de sobrevida dos doentes presentes a estudo foi de 53,6 meses. Os indivíduos que desenvolveram quadros sépticos durante o seguimento tiveram um tempo de sobrevida em meses significativamente menor (9 vs 68; p-value=0,021)

Gráfico 6 - Percentagem cumulativa de indivíduos vivos ao longo do tempo de estudo.



DISCUSSÃO

Entre 2000 e 2006, registou-se nos quatro países endémicos do sul de Europa (Portugal, Espanha, Itália e França) um total cumulativo de casos de coinfeção *Leishmania*/VIH de 2152, tendo sido reportados 223 dos quais em Portugal. O Instituto de Higiene e Medicina Tropical contabilizou 107 casos de coinfeção oriundos da região metropolitana de Lisboa, no período de 2000-2009.³⁷ Constata-se que cerca de metade dos casos de coinfeção LV/VIH nacionais neste período foram diagnosticados nesta região. Tendo presente a informação do estudo retrospectivo de uma década de Cipriano et al. (2017)¹¹, no qual foram incluídos 23 indivíduos, e os dados do presente estudo no qual avaliamos as características clínicas e o sucesso das intervenções terapêuticas e profiláticas de um grupo de 24 doentes, podemos desde já atentar na dispersão do seguimento da população coinfectada pelos centros hospitalares da região de Lisboa. A baixa incidência, a dispersão no seguimento deste grupo e o fenómeno de subnotificação desta doença, atuam como fatores limitantes á reunião de uma casuística que permita fazer inferências seguras acerca dos fenómenos analisados neste trabalho, bem como recomendações. Apesar desta limitação, podem ser identificadas razões epidemiológicas para a concentração de casos desta coinfeção nas terras em torno da capital portuguesa. Em primeiro lugar, a região de Lisboa e Vale do Tejo caracteriza-se pela sua maior densidade populacional, fluxo de pessoas e por um ambiente sociocultural que propicia contactos entre seres humanos que permitem a transmissão da infeção VIH (transmissão sexual e transmissão parentérica por partilha de seringas entre toxicodependentes). Por estes fatores a região de Lisboa e Vale do Tejo é de forma destacada a região do país com maior concentração de infeções documentadas por VIH. Sabe-se que a transmissão parentérica é responsável nos países mediterrânicos por uma larga fatia de novos casos de leishmaniose, o que podia por si só explicar a concentração de casos de coinfeção numa região com condições epidemiológicas para a aquisição de ambas as infeções. Além da transmissão parentérica, não pode ser esquecida a possibilidade de transmissão de leishmaniose visceral na região de Lisboa através da inoculação do parasita através da mosca-da-areia. Este inseto infeta mamíferos em regiões rurais, como na serra de Sintra, onde desenvolve todo o seu ciclo de vida, implicando a transmissão da infeção através deste vetor a deslocação de seres humanos a esta região (o flebotídeo não percorre mais de sem metros entre o seu local de

nascimento e de morte, ao longo do seu ciclo de vida; o flebotídeo pode ser transportado pelo vento e infetar mamíferos numa área mais periférica àquela que corresponde ao seu habitat). À semelhança da serra de Sintra, na serra da Arrábida existem as mesmas condições epidemiológicas para a transmissão de *Leishmania*.³⁸

Observando a distribuição de episódios clínicos em períodos sequenciais de três anos, parece existir uma discreta tendência para a redução do número de episódios clínicos com o decorrer do tempo de observação, além de uma progressiva redução do número de episódios clínicos do tipo episódio inaugural e um incremento do número de episódios do tipo recidiva (esta tendência apresenta como exceção o período compreendido entre 2009 e 2011). Esta distribuição temporal do tipo de episódio clínico pode ser explicada por uma diminuição efetiva no número de novos casos de leishmaniose visceral na população VIH (eventual melhor controlo clínico da infeção VIH com o surgimento de novas terapias e redução da frequência populacional da toxicofilia EV, que além de aumentar o risco de transmissão de leishmaniose, dificulta a adesão ao tratamento da infeção VIH agravando a imunodepressão e facilitando a parasitose, como será discutido adiante).

A leishmaniose, que foi considerada durante décadas uma infeção de ocorrência predominante na idade infantil³⁷, não foi relatada em nenhum caso em idade pediátrica durante o período em que decorreu o presente estudo. Esta observação está de acordo com a noção de que houve uma mudança nas características da população afetada por leishmaniose visceral, no sentido de uma maior predisposição dos adultos jovens imunodeprimidos (fenómeno que tem sido verificado desde o início da epidemia de VIH). A idade média de 39 anos e intervalo de idades de 25 a 55 anos, registados no contexto de 1º episódio clínico de coinfeção, estão em linha com as observações feitas nos demais países endémicos de Europa (77,3% dos infetados com idade compreendida entre os 31 e os 50 anos).²

A história natural da infeção por VIH caracteriza-se por um período de médio de evolução até à fase SIDA (desenvolvimento de infeções oportunistas e contagem de células T CD4+ < 200 células/ul) de 2 a 15 anos³⁹. O tempo médio compreendido entre a infeção VIH e o primeiro episódio clínico de leishmaniose visceral em contexto de coinfeção documentado neste estudo foi de 6,8 anos (com uma contagem correspondente de 65,2 células CD4+/ul). Embora a leishmaniose visceral não seja

formalmente considerada uma doença definidora de SIDA, a coinfeção está associada a maior dificuldade no controlo da progressão da imunodepressão induzida pelo vírus, condicionando maior morbilidade e mortalidade; por outro lado, a infeção VIH aumenta a probabilidade de manifestar leishmaniose na forma clínica, torna os episódios clínicos mais graves, aumenta as recidivas e os efeitos adversos da medicação e diminui a sua eficácia¹. Por detrás deste fenómeno pode estar uma sobre-regulação da via CCR5 induzida por *Leishmania*, que facilitam a entrada do VIH nas células T CD4+ (já tinha sido descrito que a doença inflamatória crónica causada pelo parasita originava um hiperativação imune que propiciava a progressão da infeção viral, com aumento das cópias virais e perda de células T CD4+).⁴⁰ Os dados deste estudo parecem estar de acordo com os fenómenos descritos na literatura, parecendo verificar-se nos doentes coinfectados uma aceleração na perda de linfócitos T CD4+ (que se apresentam no primeiro episódio clínico deste estudo com uma contagem de células CD4+ compatível com SIDA) e a morte precoce de um terço da população coinfectada no primeiro episódio clínico de leishmaniose (sendo que o grupo de indivíduos VIH não infetados por leishmaniose, mesmo sem controlo terapêutico optimizado, pode levar até quase o dobro do tempo a desenvolver uma infeção oportunista letal).

Uma percentagem de 52,3% (23/44) dos episódios clínicos de leishmaniose visceral ocorreu em indivíduos a cumprir esquema TARV. A baixa taxa de adesão á terapêutica antirretroviral pode em parte ser explicada pelo handicap social condicionado pela toxicodependência (comorbilidade que afeta 33% desta população), que conduz a uma série de comportamentos de risco caracterizados por uma negligência em relação á própria saúde. Ainda assim, a percentagem assumida de indivíduos que teve contacto com *Leishmania* através de seringas contaminadas fica assim um pouco abaixo do esperado, contando que a transmissão por partilha de seringas nos países mediterrânicos europeus atinge cerca de 60-70% na maioria das séries de casos⁴¹. Tal facto, implica que a maior parte desta população adquiriu a infeção por contacto com a mosca-da-areia, como explicado anteriormente. Existe também a possibilidade de haver uma subnotificação dos casos de toxicodependência da população em estudo (pelo estigma associado ou por haver indivíduos que tendo adquirido a infeção através da partilha de seringas, pela descontinuação do uso terem sido erroneamente considerados como não-utilizadores) e na realidade, a aquisição da infeção por toxofilia IV aproximar-se dos valores referidos na literatura.

No que toca ao perfil imunológico, registou-se uma grande aproximação nos valores médios de células CD4+, relação CD4+/CD8+ e carga viral entre os episódios inaugurais e recidivantes de leishmaniose visceral em indivíduos VIH positivos. Surpreendentemente, até se registou (embora sem significância estatística) uma maior contagem de células CD4+, relação CD4+/CD8+ com menor expansão relativa do componente T CD8+ (e, portanto, maior equilíbrio entre as duas séries linfocitárias) e menor carga viral nos episódios recidivantes, parâmetros compatíveis com melhor perfil imunitário. Desta forma, não se verificou correlação entre os episódios de recidiva da doença e uma degradação quantitativa da contagem de T CD4+ (ou da sua contribuição relativa para a população de células T) ou por um descontrolo da carga viral. A recidiva clínica da leishmaniose visceral poderá associar-se a uma capacidade incompleta de outros componentes do sistema imunitário, nomeadamente do sistema reticulo-endotelial de, por um lado, eliminar completamente o parasita de alguns focos onde pode permanecer quiescente, e por outro lado, de conseguir responder com a mesma eficácia a novas reinfeções ou ao recrudescimento de uma população quiescente, por haver uma degradação da função macrofágica. A *Leishmania* é um parasita intracelular dos macrófagos estando descrita com a progressão da infeção uma diminuição da eficácia da função macrofágica no que toca ao dano oxidativo, apresentação de antígenos, ativação imune e apoptose, enquanto a disponibilidade de nutrientes a partir do hospedeiro infetado é melhorada com o decorrer do tempo de infeção. Muitos fatores de sobrevivência de *Leishmania* estão envolvidos na formação do fagossoma e na reprogramação do macrófago para promover a infeção.⁴² O próprio vírus VIH, com tropismo descrito para o sistema monocítico-macrofágico, pode contribuir para o decair da função fagocitária, com reflexo na função deficiente destas células no controlo da infeção por *Leishmania*. Esta degradação da função fagocitária, invisível aos métodos de rastreio da função imunitária utilizados, pode explicar melhor a recidiva e a degradação clínica apresentada do que propriamente os parâmetros convencionais utilizados (contagem de células CD4+, relação CD4+/CD8+ e carga viral).

A apresentação clínica da coinfeção poderá ter sido modelada por quadros infecciosos a ocorrer em simultâneo, uma vez que a deteção da existência de um processo de leishmaniose visceral ocorreu por múltiplas vezes de forma accidental (por investigação de uma pancitopenia não explicada) em contexto de internamento por meningite, pneumonia ou quadro séptico. Desta forma, aferir que sintomatologia,

semiologia e achados imagiológicos ou laboratoriais poderão ter sido causados pela leishmaniose, e que elementos da apresentação clínica decorrem de outras complicações clínicas a decorrer em paralelo, tornou-se uma tarefa difícil. Elementos clínicos mais inespecíficos, como a febre, passível de resultar de um quadro infeccioso agudo a decorrer em paralelo, são assim menos valorizados no que toca á caracterização da apresentação clínica da população coinfectada do que alterações com maior especificidade, como a pancitopenia ou a hepatoesplenomegália. A perda de peso carece também de difícil avaliação quanto ao agente causal, uma vez que pode ser condicionado por outras infeções oportunistas (como a tuberculose) ou pelo próprio síndrome consumptivo relacionado com a VIH. O próprio desfecho do episódio clínico poderá ter sido fortemente influenciado por outras complicações, como são exemplo os quadros sépticos, que foram associados com significância estatística ao desfecho fatal. A existência de outras entidades clínicas com tanto impacto sobre a sobrevivência, como a sépsis, pode por um lado pôr em causa a leitura acerca do mau prognóstico da coinfeção (ou seja, a sépsis atuar como factor de viés, contribuindo talvez mais decisivamente para o mau prognóstico desta população, que propriamente a coinfeção LV/VIH) ou por outro, destacar a morbidade da coinfeção, no sentido em que este pode ser um subgrupo que, justamente pelas debilidades hematopoiéticas e imunitárias acarretadas pela coinfeção, apresenta pior prognóstico face a quadros sépticos, quando comparado com uma população não-coinfectada por VIH.

De acordo com a literatura, a apresentação clínica da leishmaniose visceral na população coinfectada comparada com a população VIH-negativa, caracteriza-se por uma menor frequência de desenvolvimento de hepatoesplenomegália. A explicação avançada para este fenómeno é uma menor proliferação e quimiotaxia de linfócitos e monócitos (que sofrem o efeito citopático do VIH) no fígado e baço.⁴³ Surpreendentemente registou-se uma frequência quase total de observação de hepatoesplenomegália nos episódios clínicos tidos em conta, o que pode eventualmente ser explicado pelo elevado índice de suspeição (e eventual viés de observação) para este sinal nesta patologia e nesta população em específico, sobretudo em episódios recidivantes (maior valorização de alterações morfológicas do baço e fígado em doentes com pancitopenia e clínica compatível com leishmaniose visceral). A febre ocorreu em 73% dos episódios, em concordância com as observações que têm sido feitas nas outras séries de doentes estudadas, nas quais a subpopulação coinfectada surge com uma

proporção significativamente inferior de doentes com elevação térmica (em comparação com o subgrupo VIH-negativo que se apresenta quase na sua totalidade com febre). A explicação para este fenómeno é apontada mais uma vez com a disfunção imunitária nos indivíduos seropositivos, menos capazes de mobilizar os mecanismos da febre através de pirogénios endógenos. A hipergamaglobulinémia ocorreu numa frequência correspondente ao limite inferior do intervalo esperado. Esta alteração da concentração de gamaglobulina que decorre da hiperativação policlonal de células B como resposta à infecção causada por *Leishmania*. Assim, é expectável que a expansão clonal ocorra com uma magnitude inferior em indivíduos com VIH (e menor eficiência no desenvolvimento de resposta imunitária adaptativa por défice de células T CD4+, essenciais na amplificação da resposta clonal)⁴³.

Os resultados do estudo confirmam a utilização prioritária no serviço de anfotericina B lipossómica como terapêutica primária em episódios de leishmaniose em indivíduos coinfectados com VIH. A variabilidade nos esquemas terapêuticos utilizados no que diz respeito à dosagem utilizada e número de dias de terapêutica decorreu sobretudo de adaptações da terapêutica à função renal do doente e da necessidade, em alguns casos, de intensificar dose total de fármaco administrado em indivíduos com resposta insuficiente. De registar que, apesar das cautelas tidas em relação à possível degradação da função renal induzida pelo fármaco, não houve necessidade de interromper a administração de anfotericina B e substituir a terapêutica por iatrogenia. A taxa de sucesso terapêutico de 62% registada com este fármaco neste intervalo de dosagem e por um período de 5 a 10 dias é superior tanto à taxa de resposta do grupo do estudo de Laguna et al. no qual anfotericina B lipossómica na dose de 3mg/kg/dia durante 5 dias (37%) como no grupo em que a mesma dosagem foi utilizada por 10 dias (42%). Esta observação está de acordo com a ideia de que devem ser preferidos esquemas mais longos (10 dias) e com maior dosagem parcial (5 mg/kg/dia) se tolerado. Observa-se ainda uma semelhança à taxa de resposta verificada por Ritmeijer K. *et al.* num estudo realizado na Etiópia (59,5%)¹⁶, embora no presente trabalho tenha sido utilizada uma dosagem total significativamente superior à usada em contexto etíope (chegaram a ser utilizadas dosagens totais de 50mg versus 30 mg utilizados na Etiópia). Constata-se que os casos de falência terapêutica com anfotericina B lipossómica estiveram sujeitos a muito mau prognóstico, verificando-se desfecho fatal em 12 dos 15 casos que foram tratados inicialmente com este fármaco e não manifestaram resposta

clínica e laboratorial satisfatória. Conclui-se que uma resposta positiva ao primeiro ensaio terapêutico pode ser determinante em termos de prognóstico. Provavelmente a indicação terapêutica num futuro próximo passará pela instituição terapêutica combinada como primeira linha dadas as taxas de resposta inicial e baixas taxas de recidiva documentadas (estudo de Ritmeijer na etiópia entre 2010 e 2013)¹⁷.

Os resultados do estudo apontam para a importância da instituição da profilaxia, verificada uma probabilidade de mais do dobro de recidivar sem profilaxia do que com os esquemas profiláticos instituídos (19% versus 50% respectivamente). De ressaltar ainda assim a baixa eficácia preventiva da anfotericina B lipossômica verificada neste estudo (45%), em linha com as restantes soluções profiláticas deficitárias registadas na literatura. É de notar ainda a grande heterogeneidade no intervalo em que foram administrados os esquemas profiláticos, com interrupções eletivas de profilaxia com anfotericina B lipossômica que variaram de 1 a 9 anos. Esta atitude clínica decorreu das poucas evidências existentes em relação ao tempo ótimo de administração da terapêutica com vista à prevenção de recidiva. Um estudo de 2016 de Goswami mostrou que a profilaxia secundária mensal até atingir uma contagem de células CD4+ superior a 200 cél/ul foi eficaz na prevenção da recaída e mortalidade.³⁵ Este parâmetro poderá servir de orientação em abordagens futuras em relação ao perfil imunitário adequado à descontinuação da profilaxia com segurança.

Os dados de sobrevivência registados confirmam o pior prognóstico do subgrupo coinfetado em comparação com a população VIH sem as comorbilidades leishmaniose visceral. Um terço da população faleceu no decorrer do primeiro episódio clínico e menos de metade dos indivíduos estudados estavam vivos após cinco anos de seguimento (apenas 11 em 24 indivíduos estavam vivos após um *follow-up* de cinco anos; os indivíduos VIH positivos não infetados por *Leishmania* sob terapêutica TARV têm uma mortalidade calculada de 2,3% a cinco anos de acordo com dados de 2012⁴⁴). A mortalidade no primeiro episódio neste estudo (33,3%) foi superior aos valores que tinham sido apurados na literatura para a realidade europeia (estudo retrospectivo realizado em Espanha com uma pool de 54 doentes co-infectados apontava para uma mortalidade de 18,5% no primeiro episódio). A elevada taxa de pacientes toxicodependentes com severa depleção imunitária induzida pela fraca adesão ao

tratamento e portanto, com apresentação em pior estado no primeiro episódio pode ser responsável pela elevada mortalidade neste trabalho. Apesar da elevada mortalidade inicial, após um ano de *follow-up*, a percentagem de sobreviventes (63%) compara-se á do estudo espanhol (60%). A perda de peso na apresentação clínica correlacionou-se com a mortalidade, o que pode ser explicado pela imunodepressão suplementar causada pela desnutrição, que além de dificultar o combate á coinfeção LV-HIV, propicia o desenvolvimento de infeções oportunistas (que podem condicionar quadros sépticos que mostraram ser letais nesta população; nenhum indivíduo da população que tenha sofrido um quadro séptico estava vivo no final do tempo de estudo).

CONCLUSÃO

Os dados parecem indicar uma discreta redução do número de casos LV-VIH, embora o pequeno tamanho da amostra e dispersão da população afetada pelos centros de tratamento dificulte extrapolações. No estudo realizado confirma-se o impacto da toxicodependência na transmissão da infecção parasitária, na má adesão ao tratamento e como fator de agravamento de prognóstico. Confirma-se também o efeito da infecção VIH sobre o quadro clínico da leishmaniose visceral, verificando-se uma frequência menor relativa da apresentação de febre e hipergamaglobulinémia. A coinfeção LV-VIH mostrou elevada taxa de mortalidade no primeiro episódio e uma redução drástica da sobrevida a cinco anos, quando comparada com a sobrevida da população VIH positiva sem infecção parasitária para o mesmo período de tempo. A anfotericina B lipossômica foi a terapêutica mais utilizada com uma taxa de sucesso de tratamento de 62%. Metade da população que não faleceu no primeiro episódio veio a recidivar uma ou múltiplas vezes. A profilaxia secundária revelou-se de grande importância aumentando em mais do dobro a probabilidade de evitar recidiva. Conclui-se que a LV no contexto da infecção VIH é uma doença de prognóstico reservado. A resposta à terapêutica verificada situa-se entre as melhores quando comparado a outros estudos, no entanto, parece globalmente sub-ótima (62%) e poderá sugerir a instituição de esquemas de maior eficácia, como a terapêutica combinada relatada na literatura. A profilaxia secundária, sem dúvida, está indicada dada a importância na prevenção de recaídas, embora, também aqui, a ausência de estudos comparativos dificultam uma recomendação pelo melhor esquema profilático.

REFERÊNCIAS

1. Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R,. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):286-299.
2. Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe.. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;1(97):3-15.
3. Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(4):403-407.
4. Serrada, E. A leishmaniose visceral em Portugal continental (1999-2009). Trabalho de mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa. 2010.
5. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008;24(7):324-330.
6. Alvar J, Velez ID, Bern C et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;(7).
7. Alvar J, Yactayo S, Bern C et al. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006;(22):552-557.
8. Lindoso JAL, Cunha MA, Queiroz IT et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: Current challenges. *HIV/AIDS - Res Palliat Care*. 2016;8:147-156.
9. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8): 3021
10. Marques N, Cabral S, Sá R, et al. [Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era]. *Acta Med Port*. 2007;20(4):291-298.
11. Cipriano P, Miranda AC, Antunes I et al. Leishmaniose visceral em doentes com infeção VIH: O desafio da recaída e falência terapêutica. *Acta Med Port*. 2017;30(6):443-448.

12. Williamson LM, Rosato M, Teyhan A et al. AIDS mortality in African migrants living in Portugal: evidence of large social inequalities. *Sex Transm Infect.* 2009;85(6):427-431.
13. Gill J, Lewden C, Saag M. Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies. *Clin Infect Dis.* 2010;50(10):1387-1396.
14. Laguna F, Videla S, Jiménez-Mejías ME, et al. Spanish HIV-Leishmania Study Group: Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. *J Antimicrob . J Antimicrob Chemother.* 2003;(52):464-468.
15. Laguna F, López-Vélez R, Pulido F, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-Leishmania Study Group. *AIDS.* 1999;13(9):1063-1069.
16. Ritmeijer K, ter Horst R, Chane S et al. Limited effectiveness of high- dose liposomal amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high HIV prevalence. *Clin Infect Dis.* 2011;(53):152-158.
17. Ritmeijer K. Old and new treatments for HIV/VL co-infection. In: Proceedings of the Fifth World Leishmaniasis Congress, 13–17 May 2013; Porto de Galhinas, Brazil; abstract n°468
18. Masi F Di, Ursini T, Iannece MD, et al. Five-Year retrospective italian multicenter study of visceral leishmaniasis treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):414-418.
19. Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y et al. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2006. 43: 357–364.
20. Sindermann, H., . Engel KR, Fischer C et al. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* 2004. 39:1520-1523.

21. Hailu W, Weldegebreal T, Hurissa Z et al. Safety and effectiveness of meglumine antimoniate in the treatment of Ethiopian visceral leishmaniasis patients with and without HIV co-infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010. 104: 706–712.
22. Diro E, Lynen L, Mohammed R et al. Increasing parasitological failure rate of visceral leishmaniasis to sodium stibogluconate among HIV co-infected patients in East Africa. *PLoS Neg Dis*. 2014; 8:2875
23. Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML. HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect*. 2001;(7):291-300.
24. Ritmeijer K, Veeken H, Melaku Y et al. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV have poor outcome. *Clin Microbiol Infect*. 2001;(95):668-672
25. den Boer M, Davidson R, Ritmeijer K. Treatment options for visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006;4(2):187-197.
26. van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(3):184-194.
27. Mahajan R, Das P, Isaakidis P, et al. Combination Treatment for Visceral Leishmaniasis Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus in India. *Clin Infect Dis*. 2015;61(8):1255-1262.
28. Melaku Y, Collin SM, Keus K et al. Treatment of Kala-Azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: A retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(1):89-94.
29. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO et al. Efficacy of Anti-Leishmania Therapy in Visceral Leishmaniasis among HIV Infected Patients: A Systematic Review with Indirect Comparison. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):2195
30. Lopez-Velez R, Videla S, Marquez M et al. Spanish HIV-Leishmania Study Group: Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(3):540-543.
31. Abongomera C, Diro E, Vogt F, et al. The Risk and Predictors of Visceral

- Leishmaniasis Relapse in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients in Ethiopia: A Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2017;65(10):1703-1710.
32. Molina I, Falcó V, Crespo M, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(4):837-842.
 33. Marques N, Sa R, Coelho F et al. Miltefosine for visceral leishmaniasis relapse treatment and secondary prophylaxis in HIV-infected patients. *Scand Inf Dis*. 2008; 40(6-7):523-526.
 34. Ribera E, Ocana I, de Otero J et al. Prophylaxis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Med*. 1996; 100: 496–501.
 35. Goswami R, Goswami P, Basu A et al. Protective Efficacy of Secondary Prophylaxis against Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Coinfected Patients over the Past 10 Years in Eastern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,2017; 96(2): 285–291
 36. Diro E, Ritmeijer K, Boelaert M, et al. Use of Pentamidine As Secondary Prophylaxis to Prevent Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients, the First Twelve Months of a Prospective Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):4087
 37. Campino L, Maia C. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port*. 2010;23(5):859-864.
 38. Faria TCP. Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do Município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. Trabalho de Mestrado. Fac Med Veterinária – Univ Técnica Lisboa. 2008.
 39. Moss AR, Bacchetti P, Osmond D et al. Seropositivity for HIV and the development of AIDS or AIDS related condition: three year follow up of the San Francisco General Hospital cohort. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;(296):745-750.
 40. Okwor I, Uzzona JR. The immunology of *Leishmania*/HIV infection. *Immunol*

Res. 2013;3(56):163-170.

41. Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of leishmania. *Ann Trop Med Parasit.* 2003;1(97):29-45.
42. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 2015;1(10):111-129.
43. Cota G. de Sousa M, de Mendonça A et al. Leishmania-HIV Co-infection: Clinical Presentation and Outcomes in an Urban Area in Brazil. *Neglted Trop Dis.* 2015;3(9):3653.
44. Nakagawa F, Lodwick RK, Smith CJ et al. Projected life expectancy of people with HIV according to timing of diagnosis. *Aids London.* 2012;3(26):335-346.